

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-238594

(43)公開日 平成9年(1997)9月16日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup> A 01 K 67/027 C 12 N 15/09	識別記号 ZNA	庁内整理番号 9282-4B	F I A 01 K 67/027 C 12 N 15/00	技術表示箇所 Z NAA
---	-------------	-------------------	--------------------------------------	-----------------

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平8-48948	(71)出願人 塩野義製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
(22)出願日 平成8年(1996)3月6日	(72)発明者 平沢 勉 滋賀県草津市西渋川2丁目11-56-508 (72)発明者 牧野 進 滋賀県甲賀郡水口町水口1639-28 (74)代理人 弁理士 青山 葦 (外2名)

(54)【発明の名称】 実験動物の作成方法

(57)【要約】

【課題】 実験動物の効率的な作成方法を提供する。

【解決手段】 特定の表現型を発現するモデル系のための実験動物の作成方法であって、該表現型の原因となる遺伝子変異を検出することを含む方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 特定の表現型を発現するモデル系のための実験動物の作成方法であって、該表現型の原因となる遺伝子変異を検出することを含む方法。

【請求項2】 遺伝子変異を制限断片長多型を標識として検出する請求項1記載の方法。

【請求項3】 さらに、該遺伝子変異に関してホモ、ヘテロ又は正常である個体を選別すること、及び該ヘテロ個体を交配して繁殖させることを含む請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 以下の工程を含む、特定の表現型を発現するモデル系のための実験動物の作成方法：

(1) 該表現型の原因となる遺伝子変異を含む制限酵素切斷部位を決定し、(2) 動物からDNAを抽出して(1)における制限酵素で処理し、(3) 該制限酵素による制限断片の存在に基づいて該動物が変異遺伝子に関してホモ、ヘテロ又は正常のいずれであるかを決定する。

【請求項5】 さらに、ヘテロである個体を交配させ、工程(1)～(3)を繰り返し、ヘテロまたはホモの個体を選別することを含む請求項4記載の方法。

【請求項6】 工程(3)をポリメラーゼ連鎖反応－制限断片長多型法(PCR-RFLP法)により行う請求項5記載の方法。

【請求項7】 特定の表現型が、肥満、高血圧症、糖尿病、老化、高脂血症、動脈硬化、リウマチ、免疫不全から選択される請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 肥満症またはII型糖尿病のモデル動物をスクリーニングする方法であって、肥満症またはII型糖尿病の原因となる遺伝子変異を検出することを含む方法。

【請求項9】 PCR-RFLP法により行う請求項8に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は特定の表現型を発現するモデル系、主にヒトの疾患等の研究に有用なモデル系に用いる実験動物の作成方法に関する。さらに詳しくは、目的の動物を、多数の動物の中から正確かつ迅速に選別し、実験動物を効率良く得る方法に関する。

## 【0002】

【従来技術と発明が解決すべき課題】様々な疾患の発現機構の解明、その治療や予防方法の開発を効果的に行うには、適切なモデル系を使用することが不可欠である。これまで、高血圧、糖尿病、肥満、老化、高脂血症、動脈硬化、リウマチ、免疫不全等に関連するモデル系に用いる実験動物が提供されているが、多数の候補の中から目的の表現型に関する実験動物を効率良く選択し、作成する方法は確立されていない。一方、遺伝子解析技術の発達に伴って、様々な表現型の原因となる遺伝子変異の

存在が明らかにされてきた。染色体上の、ある表現型(例、疾患)の原因となる変異を有する遺伝子を $m$ (劣性遺伝子の場合)、変異を有しない遺伝子を+で表すと、該変異遺伝子による形質を発現している個体は、変異をホモを持つ $m/m$ 個体のみである。しかし、ホモ個体の多くは不妊であったり、繁殖力が極めて弱い場合があり、こうした変異動物は、モデル動物として有用であるが、繁殖には不適当である。従って、特定の表現型を有するホモ個体を得るには、変異をヘテロにもつ個体( $m/+$ )同士を交配し、その仔から $m/m$ 個体を選択するのが最も効率的である。しかしながら、従来は、ヘテロ個体と変異をもたない(+/+)正常個体とが外見上区別できないので、ある個体の遺伝子型がヘテロ又は正常のいずれであるかを産まれた仔の表現型に基づいて判定(後代検定)しなければならなかった。そのためには、繁殖の目的にはヘテロ個体及び正常個体を区別せずに交配させ、生まれた仔の中からホモの形質を発現している個体を選択する方法をとっており、親動物が多数必要であった。また、遺伝子型はホモであっても形質の発現を検出しにくいモデル系もあり、こうした場合、遺伝子型判定の信頼性にも問題があった。また、 $m/m$ 個体を用いる研究では、コントロールとして同腹のヘテロ個体( $m/+$ )及び正常な遺伝子を有する個体(+/+)を用いるが、上記のごとく、これらヘテロ個体と正常個体が区別できないために、+/?個体として用い、遺伝子型を後代検定により判別しなければならず、時間及び労力の面でも不経済であった。

【0003】 例えば、ヒトにおける肥満のモデル系として用いられる肥満マウスの場合、その肥満形質を決定する単一遺伝子変異として、少なくとも6対の遺伝子座におけるものが知られており、いずれも常染色体上にマッピングされている。その1つである $obese$ (ob)遺伝子による肥満は既に1950年に報告され、以後、主にC57BL/6Jを遺伝背景とするC57BL/6J-obコンジェニックマウスが肥満及びII型糖尿病のモデル動物として利用されている。 $ob$ 遺伝子はY. Zhangら(Y. Zhang et al., Nature 372 1994, 425-432)により1994年にクローニングされ、そのcDNAの塩基配列が決定されている。この $ob$ 遺伝子は第6染色体に位置する単一劣性遺伝子であり、該遺伝子における変異が、マウスに、ヒトの肥満やII型糖尿病と同様の表現型をもたらすことが知られている。ところで、本遺伝子をホモにもつ $ob/ob$ 肥満個体は雌雄とも不妊であるために、肥満個体を得るには外見上正常な個体から $ob$ 遺伝子をヘテロにもつもの( $ob/+$ )を選び、交配する必要があるが、従来は、ヘテロ個体と正常個体とを外見から判断することが困難なため、これらをランダムに交配させていた。また、上記のごとく、このような $ob/ob$ マウスを用いる研究では、コントロールとして同腹の+/?マウスを用いており、それらがヘテロ又は正常個体のいずれであるかを判定する

必要がある場合には、後代検定で判定しなければならなかつた。このように従来は、実験動物の製造及び確認のために多大の労力と時間が必要であり、非効率的であつた。なお、これらの問題は、変異遺伝子が劣性の場合のみならず、変異遺伝子が優性（M）の場合（該変異遺伝子による形質を発現する個体は、変異をホモに持つM/M及びヘテロに持つM/+である）にも、存在しており、その解決が待たれていた。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は上記の課題を解決し、特定の表現型を有するモデル系のための実験動物の効率的な作成方法であつて、該表現型の原因となる遺伝子変異を検出することを含む方法を提供するものである。本発明方法は、分子生物学的手法による遺伝子のタイピングを利用して目的の表現型の原因となる遺伝子変異の存在を検出することにより、所望の実験動物を作成する。そのためには、分子生物学の分野で変異を有する遺伝子の検出に用いられる任意の方法を採用することができる。例えば、制限酵素切断部位の存在に基づく、制限断片長多型（restriction fragment length polymorphism, RFLP）を標識とする方法、特異的プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション法、PCR-SSCP（Single Strand Conformation Polymorphism）法等を挙げることができる。

【0005】本明細書中、「実験動物」なる語句は、特定の表現型に関するモデル系に用いる実験用の動物を指す。「モデル動物」とは、実験動物の内、特定の表現型を発現している個体であつて、該表現型の原因となる変異遺伝子を「ホモ」あるいは「ヘテロ」（特に優性遺伝子の場合）にもつ個体を指す。従つて、上記実験動物には、変異遺伝子をホモにもつ個体、ヘテロにもつ個体のみならず、正常な個体の全てが含まれる。

【0006】上記のごとく、本発明方法には、分子生物学的手法による遺伝子のタイピングを用いるが、RFLP標識を用いる方法が好ましい。RFLPの検出は、当該技術分野で既知の方法で行うことができ、サザンプロッティング法や、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）によるDNAの特定の領域の増幅、制限酵素処理及び電気泳動を組み合わせる方法等がある。後者の場合、放射能標識する必要が無いので安全性等の観点から好ましい。本発明方法には、ある個体が、特定の表現型の原因である変異遺伝子をホモ又はヘテロに有する個体であるか否かを判定するのに有用であることを条件として、様々なRFLP標識を用いることができるが、制限酵素切断部位に遺伝子の変異が含まれるようなRFLP標識を選択するのが望ましい。そのようなRFLP標識が特定されれば、被検動物から得たDNAを対応する制限酵素で処理し、制限断片の存在を、例えば電気泳動によって確認することにより、該動物がホモ、ヘテロ又は正常のいずれであるかを容易に決定す

ることができる。得られたホモあるいはヘテロ個体のあるもの（m/m、M/M、M/+）はモデル動物として有用であり、ヘテロ個体のあるもの（m/+）及び正常個体は、研究のコントロール動物として有用である。さらに、ヘテロ個体を交配することにより効率良くホモ個体の子孫を作成することができる。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】本発明方法による、特定の表現型を有するモデル系のための実験動物の作成は、通常以下の工程を含む。

（1）該表現型の原因となる遺伝子変異を含む制限酵素切断部位を決定し、（2）動物からDNAを抽出して（1）における制限酵素で処理し、（3）該制限酵素による制限断片の存在に基づいて該動物が変異遺伝子に関してホモ、ヘテロ又は正常のいずれであるかを決定する。さらに、ヘテロである個体を交配させ、工程（1）～（3）を繰り返すことにより、目的の実験動物を多数得ることができる。上記の工程（3）における制限断片の存在は、制限断片の数及び／又はサイズに基づいて行うことができる。好ましくは、RFLPの検出に関する該工程（3）は、PCRによる適切な領域の増幅、制限酵素処理及び電気泳動を組み合わせて行われる。

【0008】本発明方法は、遺伝子の変異が原因である表現型に関するモデル系に用いる実験動物の作成に有用であるが、そのようなモデル系としては、肥満、糖尿病、高血圧、老化、高脂血症、動脈硬化、リウマチ、免疫不全等がある。また、動物の種類は特に制限されないが、マウス、ラット、ウサギ等を例示することができる。以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、これらは、本発明を限定するものではない。

#### 【0009】

##### 【実施例】

実施例1 肥満に関するモデル系の実験動物の作成  
ヒトの肥満およびII型糖尿病のモデル動物として用いられているC57BL/6J-obマウス及び塩野義製薬で開発された同じ肥満形質を有するFLS-obマウスを用いた。これらの動物は、いずれも肥満遺伝子に変異を有しており、変異遺伝子をホモに有する個体は、肥満形質を発現する。なお、以下の説明で、obは変異のある肥満遺伝子を意味している。

##### （1）DNAの抽出

被検動物の、尾又は肝より、DNA抽出キット（QIAamp Tissue Kit）を用い、該キットに付属の説明書に従つて、DNAを抽出した。繁殖に用いる動物の場合、尾の先端を0.5cm切断し、DNA抽出に用いた。傷口を外科用接着剤により密封後、被検個体の飼育を続け、肥満個体以外は後代検定により、各被検動物の遺伝子型〔+/-（正常）、ob/-（ホモ）及びob/+（ヘテロ）〕を判定した。分子生物学的手法によるob遺伝子のタイピングは、下記のごとく、適切な変異配列の決定、

PCRによる変異を含む領域の増幅、制限酵素処理、及び電気泳動による制限断片の検出により行った。

#### 【0010】(2) RFLP標識の決定

文献(Y. Zhang et al., Nature 372 1994, 425-432)記載の肥溝形質を決定する遺伝子変異の中から、標識として、ヌクレオチド番号427-431における変異配列を用いた。この変異配列(CTGAG)は制限酵素Dde Iによる切断部位である。従って、該変異遺伝子を有する個体から得たDNAはDde Iにより切断されるが、正常な配列(CCGAG)を有するDNAは切断されないので、RFLP標識として有用であると予測される。

#### 【0011】(3) PCR法

公表されたob遺伝子cDNAの塩基配列(Y. Zhangら、前掲)に基づいて、上記(2)で決定したRFLP標識の5'側及び3'側にプライマー1(=forward primer)及びプライマー2(=reverse primer)を設定し、合成した。これらプライマー1及び2のヌクレオチド配列を配列表の配列番号1及び2に示す。また、プライマー1及び2とRFLP標識との関係を図1に示す。図1において、ヌクレオチド番号427-431の配列に関連し、矢印の上方には正常な配列、下方には変異配列が記載されている。従って、変異遺伝子では、プライマー1及びプライマー2の間に、ヌクレオチド番号415-419のScrF I及び448-451のHae II各制限酵素切断部位に加えて、427-431のDde I制限酵素切断部位がある。PCRは、上記(1)で被検動物から抽出したDNA 100-200ng、Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造)0.5単位、dNTPミックス(宝酒造)及び1mM MgCl<sub>2</sub>を含有するバッファー(宝酒造)を含む全量20μlの反応液中(ミネラルオイル1滴を重層)、上記プライマー1及び2の存在下、サーマルシーケンサーTSR-300(岩城硝子)を用いて行った。条件:94℃, 15分[94℃, 1分; 55℃, 1分; 73℃, 1分]を30サイクル、次いで73℃, 5分。このようにしてプライマー1及び2を用いて、各被検動物から抽出したDNAの、図1に示すRFLPを含むDNA領域を増幅した。

#### 【0012】(4) 制限酵素処理

上記(3)で増幅したDNA断片を制限酵素Dde I(東洋紡)で、添付の説明書に従って処理し、アガロースゲル電気泳動に供し、写真撮影して出現したバンドの数から、RFLP標識の有無を判定した。まず、PCR産物8μlを2-4単位のDde Iで、添付の反応用のバッ

ファーを用い、37℃において1.5~2時間消化した後、消化反応混合物を4%アガロースゲル電気泳動に供して、エチジウムプロマイド染色の後紫外線照射のもと写真撮影を行い、バンドを観察した。対照として、未処理のPCR増幅断片、及び制限酵素ScrF I(東洋紡)を用いてDde I消化と同様に、添付の反応用バッファーを用い、37℃において1.5~2時間消化処理し、得られた反応混合物をアガロースゲル電気泳動に供した。なお、負対照として、DNAの代りに滅菌蒸留水を用いて同様に処理した。結果を図2に示す。図中、MはDNAサイズメーカー、1、2、3は、未処理群、5、6、7はDde I処理群、8、9、10はScrF I処理群を表す。各群において、1、5、8は後代検定で+/(正常)、2、6、9はob/ob(ホモ)、そして3、7、10はob/+(ヘテロ)であることが確認された個体から抽出したDNAである。また、4は負対照を表す。結果を、遺伝子変異の検出のための標識として選択したRFLPに基づいて評価した。即ち、各固体の遺伝子型を、バンドの数により以下の基準に従って判定した。

+/(正常); 変異遺伝子が存在しないので、PCR産物は制限酵素処理で切断されず、バンドは1本である。

ob/ob(ホモ); 変異遺伝子が両方の染色体に存在するので、PCR産物は制限酵素処理により完全に切断され、バンドは2本である。

ob/+(ヘテロ); 変異遺伝子が片方の染色体のみに存在するので、バンドは3本である。

図2から明らかに、Dde I処理群の5では140bpにおける1本のバンド(正常)；6では96bp及び44bpにおける2本のバンド(ホモ)；そして7では140bp、96bp及び44bpにおける3本のバンド(ヘテロ)が観察されており、後代検定により決定された遺伝子型と一致している。一方、制限酵素ScrF Iで処理した場合には、適切なバンドの変化が観察されず、本発明方法には適さないことが分かる。

【0013】次いで、約600匹のC57BL/6J-ob及びFLS-obマウスから抽出したDNAを用い、上記と同様、プライマー1及び2を用いるPCR法、制限酵素Dde I処理及び電気泳動により、RFLP標識の存在に関して検査し、後代検定の結果と比較した。結果を表1に示す。

【表1】

## obマウスの遺伝子型別成績

系統		検査匹数	ob/ob	ob/+	+/+
C57BL/6J-ob	♀	380	4	236	140
	♂	212	4	124	84
	小計	592	8	360	224
FLS-ob	♀*	28	14	14	0
	♂	20	0	14	6
	小計	48	14	28	6
合計		640匹	22匹	388匹	230匹

\*コントロールとして使用

表1から明らかに全例で判定が可能であり、後代検定の結果と不一致は認められなかった。このようにしてob/ob（ホモ）と判定された動物はそのまま肥満のモデル動物として用いられ、またob/+（ヘテロ）と判定された動物は、さらに交配して繁殖に供することができる。また、肥満マウスと同腹のヘテロ及び正常マウスは、該肥満マウスを用いる実験のコントロールとして有用である。

## 【0014】実施例2 肥満マウスの作成

実施例1と同様にして、プライマー1及び2を用いるPCR法、制限酵素DdeI処理及び電気泳動により、RFLP標識の存在に関して検査し、ヘテロと判定された個体を交配して繁殖させ、C57BL/6J-ob/obマウスを作成した。1カ月あたり120匹のob/obマウスを得るために必要な親マウスの数を、従来のランダムにヘテロ個体及び正常個体を交配させる方法の場合と比較して表2に示す。

【表2】

## 遺伝子型別導入の繁殖面への寄与

C57BL/6J-ob/obマウス		120匹／月供給の場合
従来法（後代検定法）		
♀ ob/+	+/+	510匹
♂ ob/+		22匹
		532匹(100%)
改良法		
♀ ob/+		320匹
♂ ob/+		14匹
		334匹(63%)
改良法、♀1:♂1同居		
♀ ob/+		200匹
♂ ob/+		200匹
		400匹(75%)

表中、改良法とは、ヘテロと判定された個体のみを交配させる方法、改良法♀1:♂1同居とは、ヘテロと判定された♂1匹と♀1匹を同居交配させる方法（通常♂1匹と♀2~3匹を同居させる）を意味する。表2から明らかに、従来法の場合には、正常マウス（+/+）が混在するために、多数の親マウスが必要であるが、本発明のPCR-RFLP法を用いれば、確実にヘテロ型のマ

ウスのみを親マウスとして用いることができるので、有意に少ない数の親マウスから効率良くob/obマウスが得られる。また、同腹の親から得た仔の遺伝子型を本発明方法で判定する場合と、後代検定法で判定する場合の時間的な相違を表3に示す。

【表3】

## obマウスの遺伝子型別の時期

## 従来法(後代検定法)

ob/ob 5-6w 判定

ob/+、+/  
(♀の場合) 交配 10w → 13w → 18w → 21w → 26w  
1回目の出産 仔の判定 2回目の出産 仔の判定

## 改良法

ob/ob、ob/+、+/  
5-6w 判定(出生時以後、いつでも可能)

表中、後代検定における「仔の判定」は、ob/obの仔の有無に基づいて行われる。表3から明らかなように、本発明方法によれば、個体の判定に時間的な制約が殆ど無く、極めて効率的に実験動物を作成することができる。

【0015】

【配列表】

## 配列

TCCAAGATGG ACCAGACTCT

【0017】配列番号2:

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

## 配列

AGGGAGCAGC TCTTGGAGAA

【図面の簡単な説明】

【図1】 肥満マウスのob遺伝子上の、変異を含む制限酵素Dde I切断部位(RFLP標識)と、プライマー1、2の関係を示す模式図。

【0016】配列番号1:

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

20

鎖の数: 一本鎖

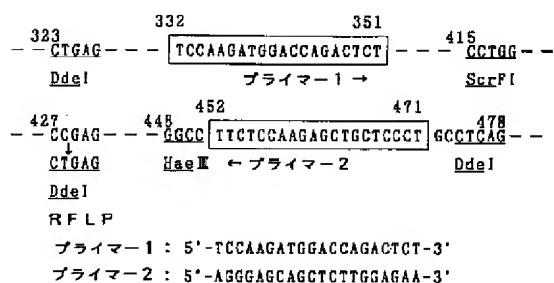
トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

20

【図2】 図1に示すプライマー1及び2を用いてPCRにより増幅したDNA断片を制限酵素Dde I又はSce Iで処理し、反応混合物をアガロースゲル電気泳動に供し、泳動パターンを写真撮影して得た写真の模写図。

## 【図1】



【図2】

